In the name of Allah, the Most Gracious, the Most Merciful









DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

La mission d'un laboratoire de virologie

- **Le diagnostic par isolement des virus et leur identification (grippe, entérovirus)**
- **Suivre l'évolution biologique de l'infection**
- **Prévenir la transmission des virus par les produits biologiques et le don d'organes (HIV, HCV)**
- **Apprécier l'état immunitaire d'un individu ou d'une population (rubéole, hépatites)**

Il existe 02 méthodes:

- **Diagnostic direct: détection du virus lui-même ou un de ses composants (génome, antigènes)**
- **Diagnostic indirect: m.e.e de la réaction immunitaire spécifique contre le virus (anticorps Ac)**

DIAGNOSTIC DIRECT

- **Virus: parasitisme intracellulaire obligatoire**
- **Isolement nécessite des cellules vivantes (in vitro, animal sensible (cobaye), œuf de poule embryonné)**

Les prélèvements

- **Sang: virémie: plusieurs virus**
- **Selles: entérovirus, virus polio, rotavirus**
- **Prélèvements respiratoires: écouvillonnage nasal, aspiration bronchique, lavage broncho-alvéolaire**

  Paramyxovirus, adénovirus
- **Urines: CMV, rubéole**
- **Prélèvements cutanés: vésicules (HSV, VZV)**
- **LCR: HSV**
- **Prélèvement oculaire: par écouvillonnage conjonctival, conjonctivite (adénovirus), kératite (HSV, VZV)**
- **Liquide amniotique (CMV, VZV)**

- **Les virus sont fragiles, sont présents dans des cellules infectées, fragiles (risque de lyse et de mort)**
- **Plusieurs éléments conditionnent la réussite d'un isolement par culture; le prélèvement doit être bien fait dans de bonnes conditions et en quantité suffisante**
- **Le transport vers le labo, doit être rapide <1 h**
- **Sinon conservation à +4° qq heures (glacière et icebox)**
- **Ou à -80° > 36 heures**
- **règles de sécurité +++**
- **+/- traitement pour décontamination**

I/ Isolement du virus

- Isolement sur culture cellulaire

- Systèmes de cellules vivantes cultivées in vitro
- Chaque virus a un tropisme cellulaire propre
- Pas de système cellulaire universel
- Production de modifications morphologiques **ECP**
- Aspect de l'ECP est évocateur de tel ou tel virus

✓ Ballonisation: HSV

✓ Arrondissement des cellules avec inclusions cytoplasmiques refoulant le noyau vers la périphérie: (entérovirus)

✓ Formation de syntitia: virus de la rougeole

- **ECP: diagnostic d'orientation**

- **La confirmation fait appel à des méthodes immunologiques:**
- **IF ou ELISA: par des Ac monoclonaux spécifiques**
- **Séroneutralisation avec des antisérums:**

✓ **inhibition de l'ECP virus cytopathogènes**

✓ **inhibition de l'hémagglutination virus hémmagglutinants**



Poste de travail pour les cultures virales :
hotte à flux laminaire, matériel jetable et stérile

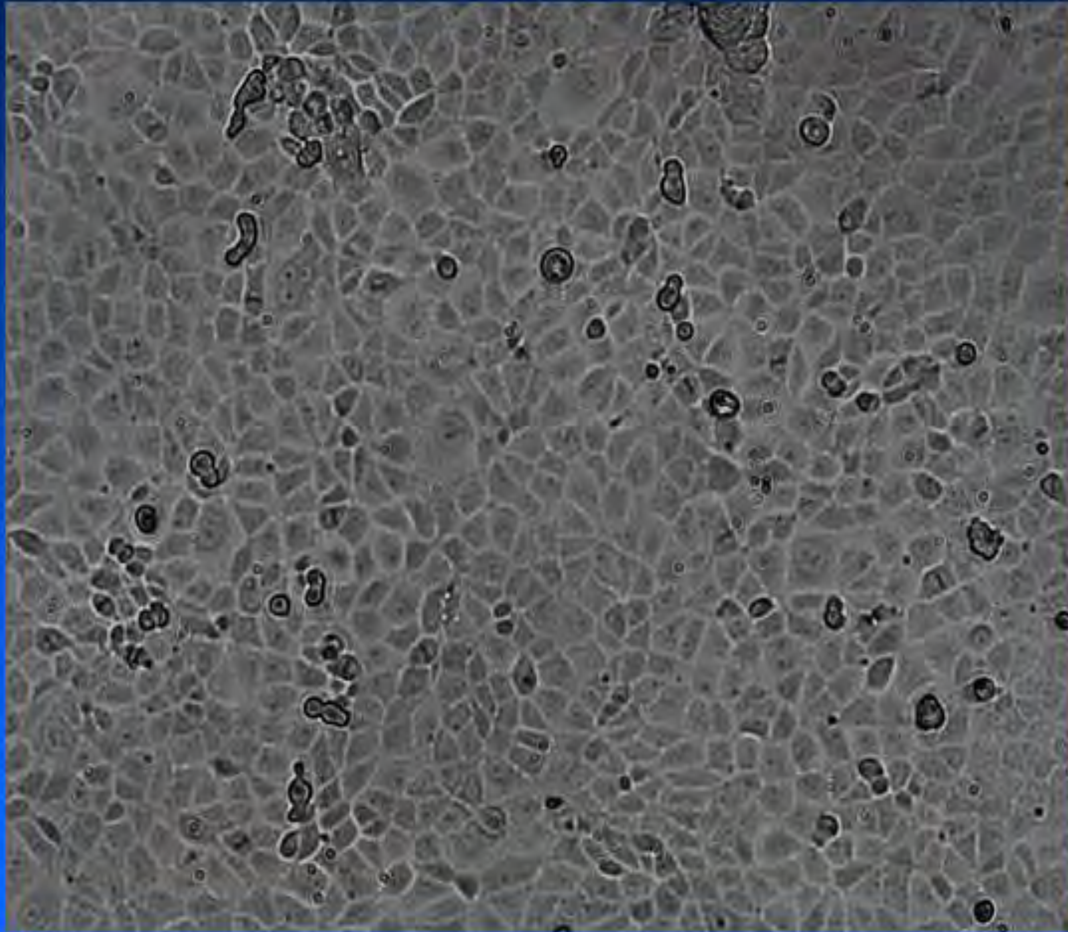


Observation de cultures cellulaires

03 types de cellules

- **Cellules de culture primaire: 1ers éléments cellulaires cultivés in vitro à partir de tissus rein de singe, cornée de lapin**
- **Cellules de culture secondaire: à partir de tissus embryonnaires humains (poumon)**
- **Lignées continues: cellules hétéroploïdes transformées immortalisées (Vero, Mdck) ou obtenues de tissus cancéreux (Hep 2, Hela)**

Les cellules



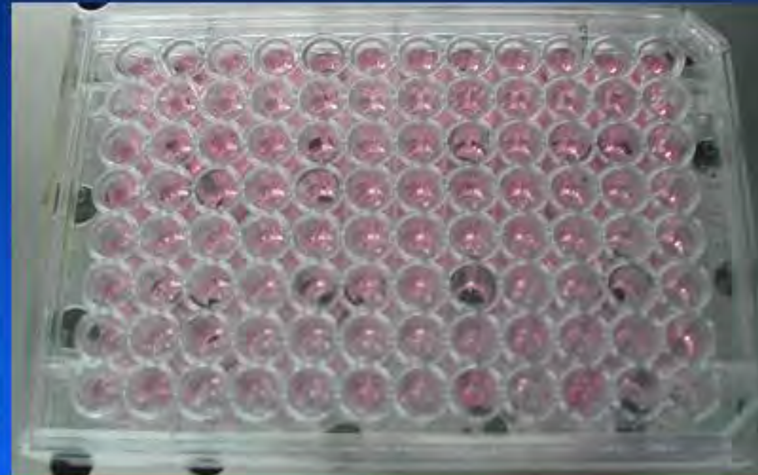
Les supports



Supports de cultures cellulaires

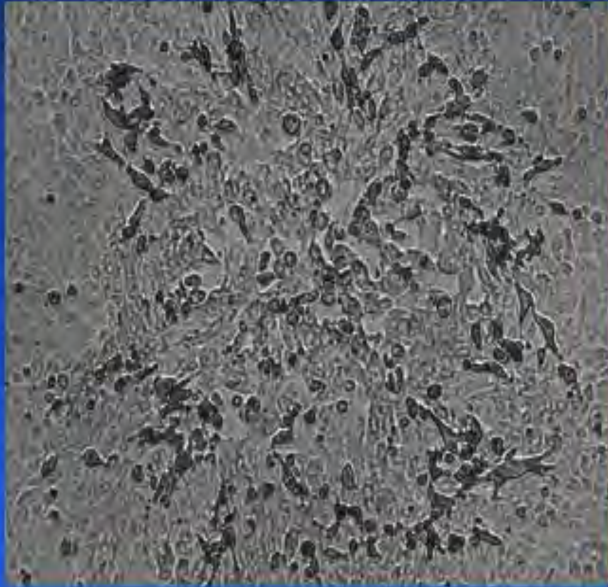


Plaque de 6 puits

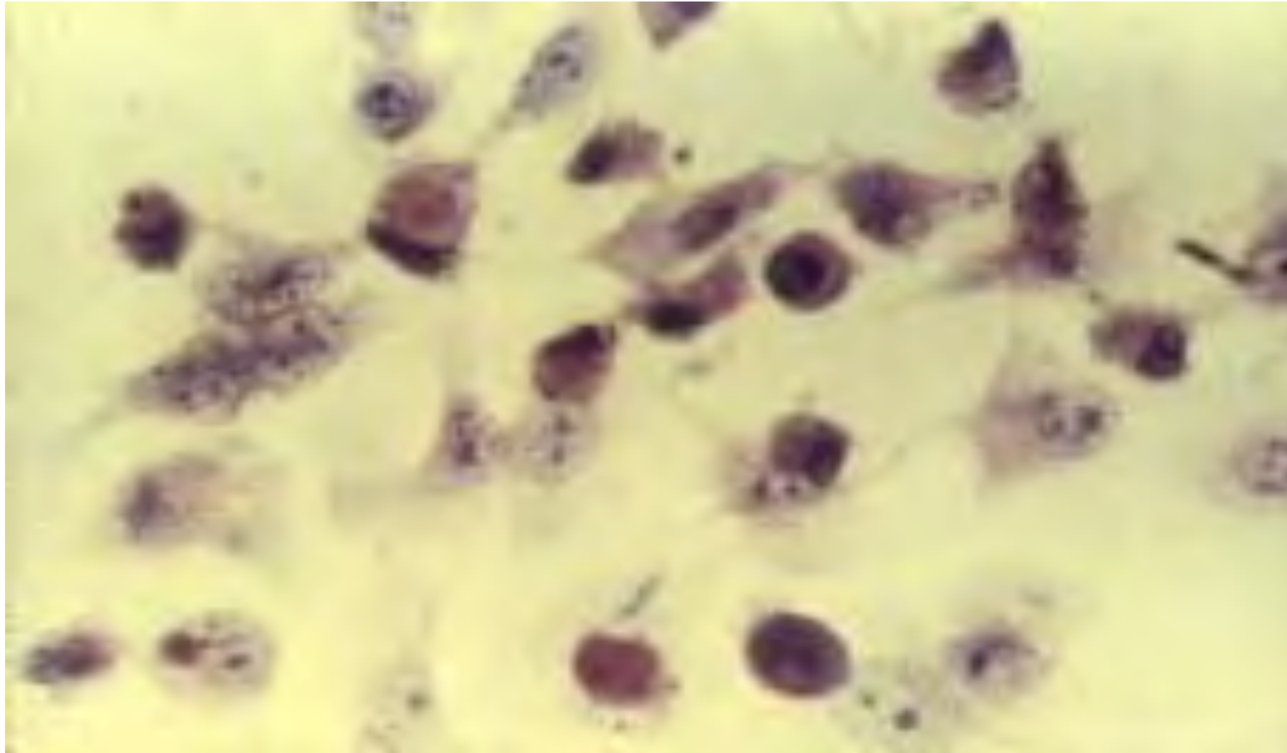


Plaque de 96 puits

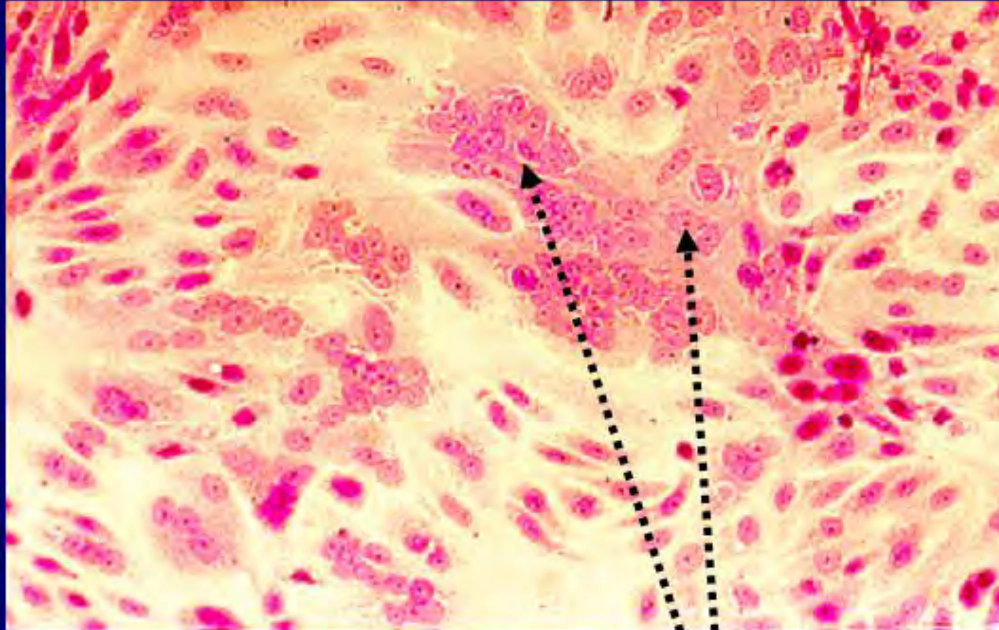
Effet cytopathogène





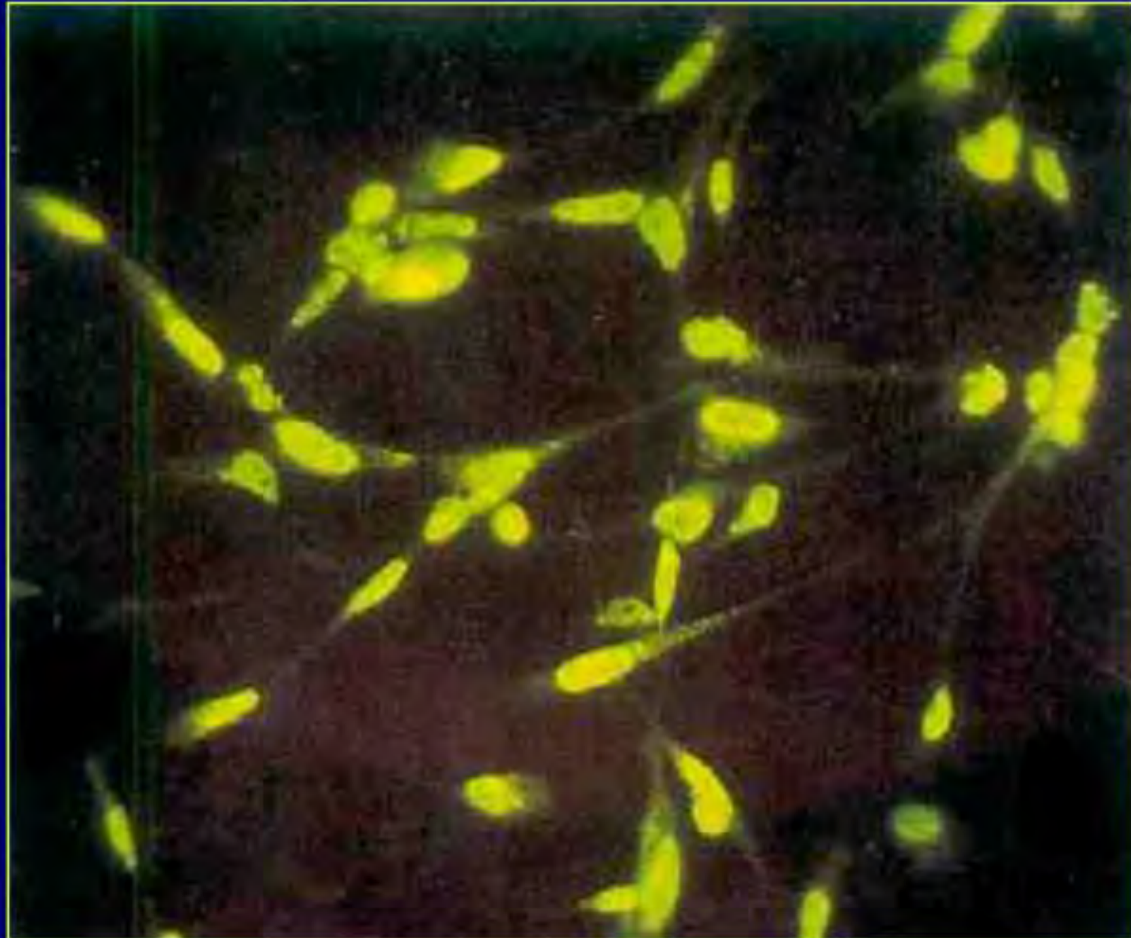


Par comparaison, ECP caractéristique d'une culture d'entérovirus : *inclusions intra-cytoplasmiques et noyau hyperdense repoussé en périphérie de la cellule.*



Formation de syncitia

Culture de virus respiratoire syncytial



Culture de virus grippal sur cellules MDCK
Révélation par immunofluorescence

- inoculation à un animal sensible

- **Certains virus ne peuvent être isolés que sur animaux**
- **la multiplication du virus chez l'animal ⟹ pathologie définie**
- **Exemple: coxsackievirus A injecté chez des souriceaux nnés ⟹ paralysie + mort**

- Isolement sur œuf de poule embryonné

- Virus de la grippe
- Inoculation du prélèvement à des œufs embryonnées de 8 à 11j au n° de la cavité amniotique ou allantoïque.
- Recueil du liquide après 72 h et détection par une Rt d'hémagglutination
- Virus grippe (hémagglutinines) + GR hémadsorption
- Intérêt: production des vaccins

Isolement: technique laborieuse et fastidieuse

Avantages

- m.e.e virus permet leur étude
- Sensibilité ++++ 1 à 10^2

virions

Inconvénients

- Qualité du pvt (transport et conservation)
- Technique longue et couteuse
- Virus: pas d'ECP
- Virus non cultivable

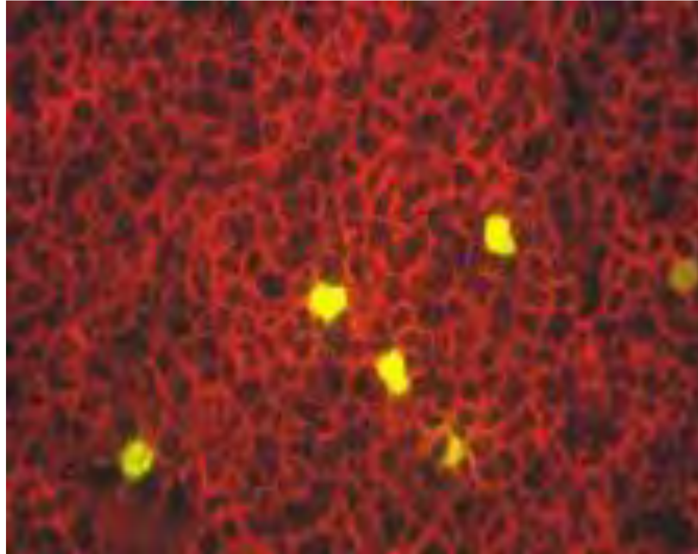
II/ détection des Ag viraux

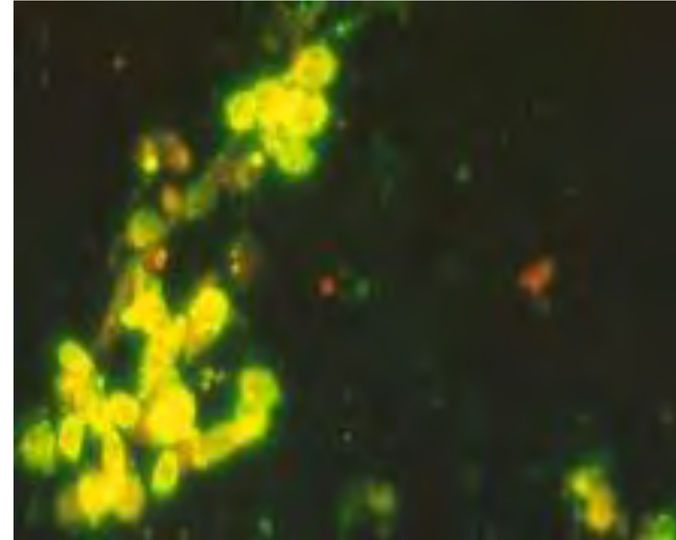
- Directement dans le prélèvement grâce à des Ac monoclonaux spécifiques
- Le principe: virus (pvt) + Ac spécifique ⇨ Rt
- Méthodes:

✓ Immunofluorescence

✓ ELISA

✓ Agglutination: +++ rapidité exp: rotavirus dans les selles





Immunofluorescence



Test d'agglutination pour la recherche de Rotavirus dans les selles

III/ Recherche du génome viral

- **Pvts: sang, LCR, liquide amniotique**
- **Principe: m.e.e du matériel génétique ADN ou ARN**
- **Techniques de biologie moléculaire: quantitative, qualitative**
- **02 technique: hybridation et amplification**

Hybridation

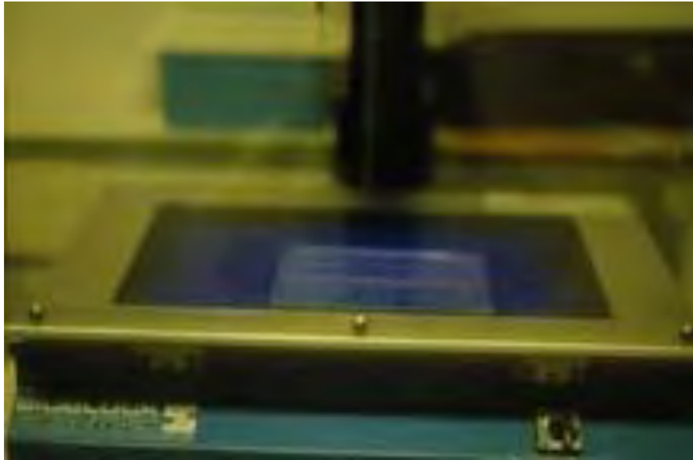
- **Principe: complémentarité entre les bases nucléotidiques des Ac nucléiques**
- **Utilisation de séquences nucléotidiques (complémentaires à des séquences connues et stables du virus recherché), marquées (chimique, Rx actif) = sonde**
- **Matériel génétique du virus étudié + sonde: résultat positif → Radioactivité ou révélation chimique**

Amplification

- **PCR (polymérase chaine reaction) ou réaction de polymérisation en chaine, est la plus utilisée**
- **Extraction de l'ADN ou de l'ARN viral**
- **Amplification c.a.d production de plusieurs copies du génome**
- **+ bases + enzymes**
- **Révélation par électrophorèse en gel d'agarose**



Thermocycleurs conventionnels





Gel d’agarose après PCR et électrophorèse. Le gel est photographié sous lumière UV. Les signaux positifs apparaissent sous l’aspect de bandes claires nettes (flèche). Le résultat n'est interprétable que s'il existe des témoins positifs (la réaction a fonctionné) et un témoin négatif (il n'existe pas de contamination).

- **Inconvénient majeur:**
  la contamination → faux +
- **Avantages:**
  -sensibilité → < 10 copies
  -rapidité

IV/ Microscopie électronique

- Moyen de diagnostic possible
- Morphologie du virus par image caractéristique
- Exp: rotavirus (forme de roue)

  coronavirus (forme de couronne)
- +++ nouveaux virus

DIAGNOSTIC INDIRECT

- **Rechercher le témoin de l'infection virale , les Ac antiviraux spécifiques**
- **+++ dans certaines infections: HIV, HBV, HCV, rubéole**
- **Rechercher les AC dans le sang++++, parfois autres compartiments (LCR, liquide articulaire)**
- **Les Ac: IgG ++++, parfois IgM (primoinfection rubéole), rarement IgA (EBV)**



Prélèvements de sang en tube sec et tube gélosé utilisés pour la sérologie: le sang est centrifugé et les sérums sont gardés puis utilisés pour les différents tests sérologiques.

Le diagnostic sérologique permet de:

- Confirmer une infection récente
- Témoigner d'une infection ancienne (rubéole, hépatite A)
- Témoigner d'un titre vaccinal protecteur (hépatite B)
- Prouver que le sujet est porteur du virus (HIV) ou est susceptible de présenter des récurrences (CMV, EBV, HSV)

Les techniques

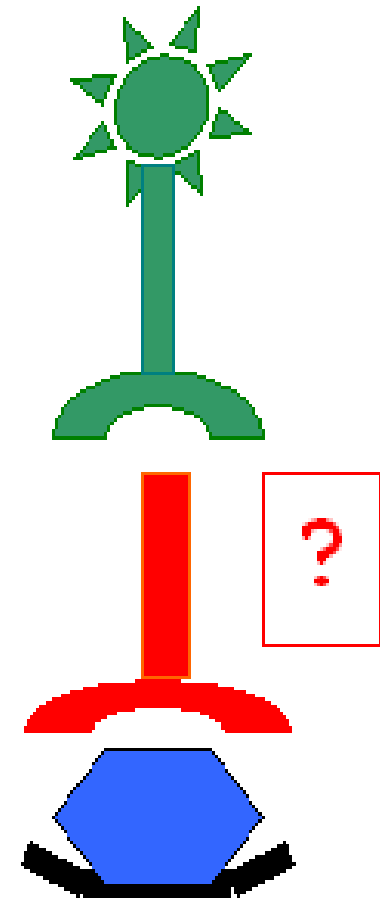
- **ELISA +++++**

Ac (sérum du patient) – molécule (complémentaire)*enzyme + substrat de l'enzyme → virage colorimétrique mesurée DO

Principe de la réaction ELISA

- Formation d'un complexe antigène - anticorps
  - Sérum supposé contenir les anticorps recherchés
  - Antigène (réactif commercial) adsorbé sur un support plastique (plaque 96 puits)

Détection du complexe antigène-anticorps par fixation d'un anticorps anti-immunoglobuline humaine marqué (réactif commercial)
- par une enzyme (méthode immuno-enzymatique)
- par une molécule fluorescente (immuno-fluorescence)





Aspect d'une plaque de réaction ELISA en fin de manipulation : les puits fortement colorés correspondent à des sérums positifs pour la réaction ELISA. La lecture automatisée des densités optiques est réalisée sur un spectrophotomètre.

Appareils pour ELISA





- **Immunofluorescence:**

  m.e.e du complexe (Ac-Ag) par des Ig humaines * par un fluorochrome fluoresceine

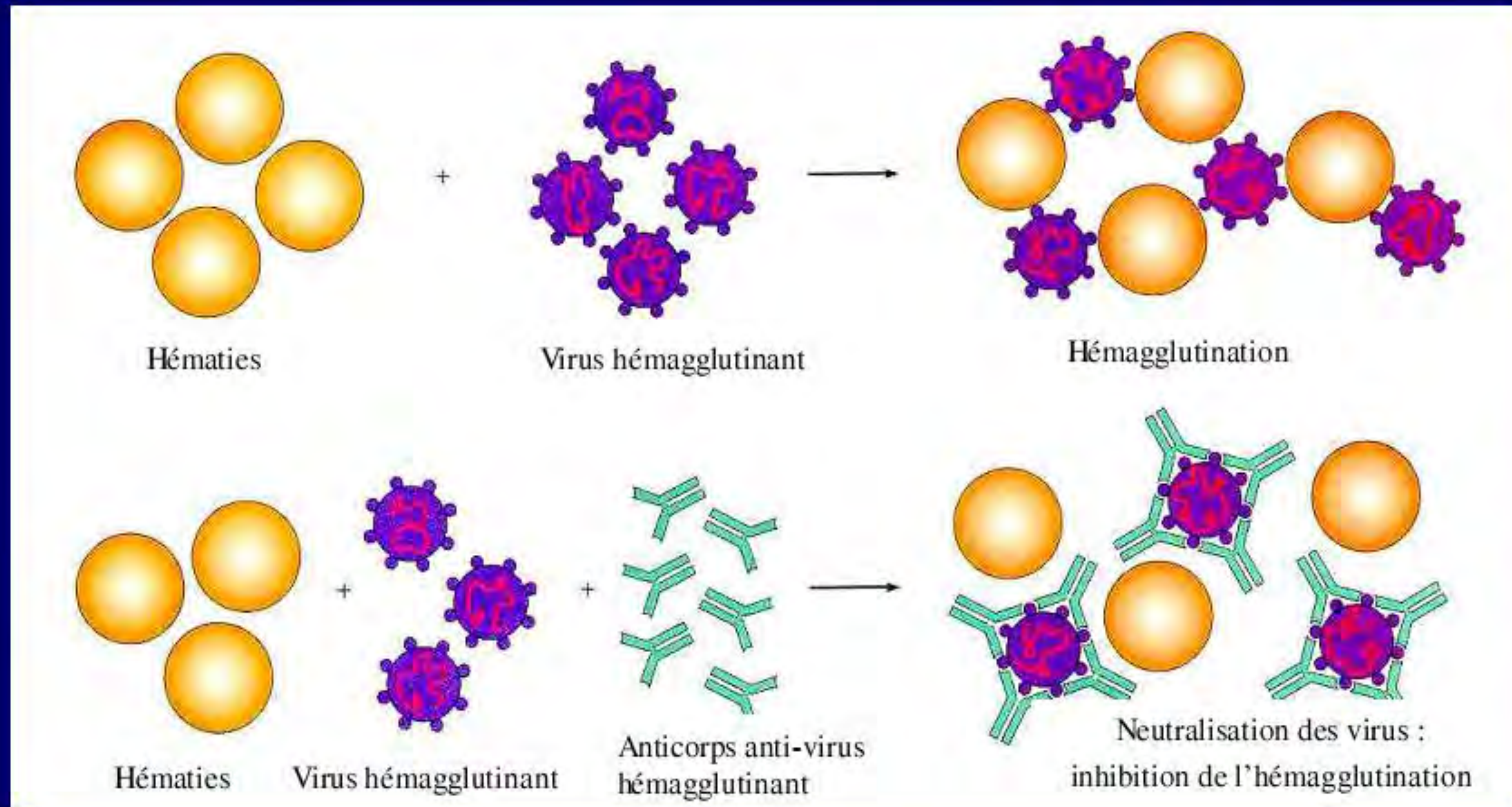
- **Inhibition de l'hémagglutination: pour les virus possédant une hémagglutinine**

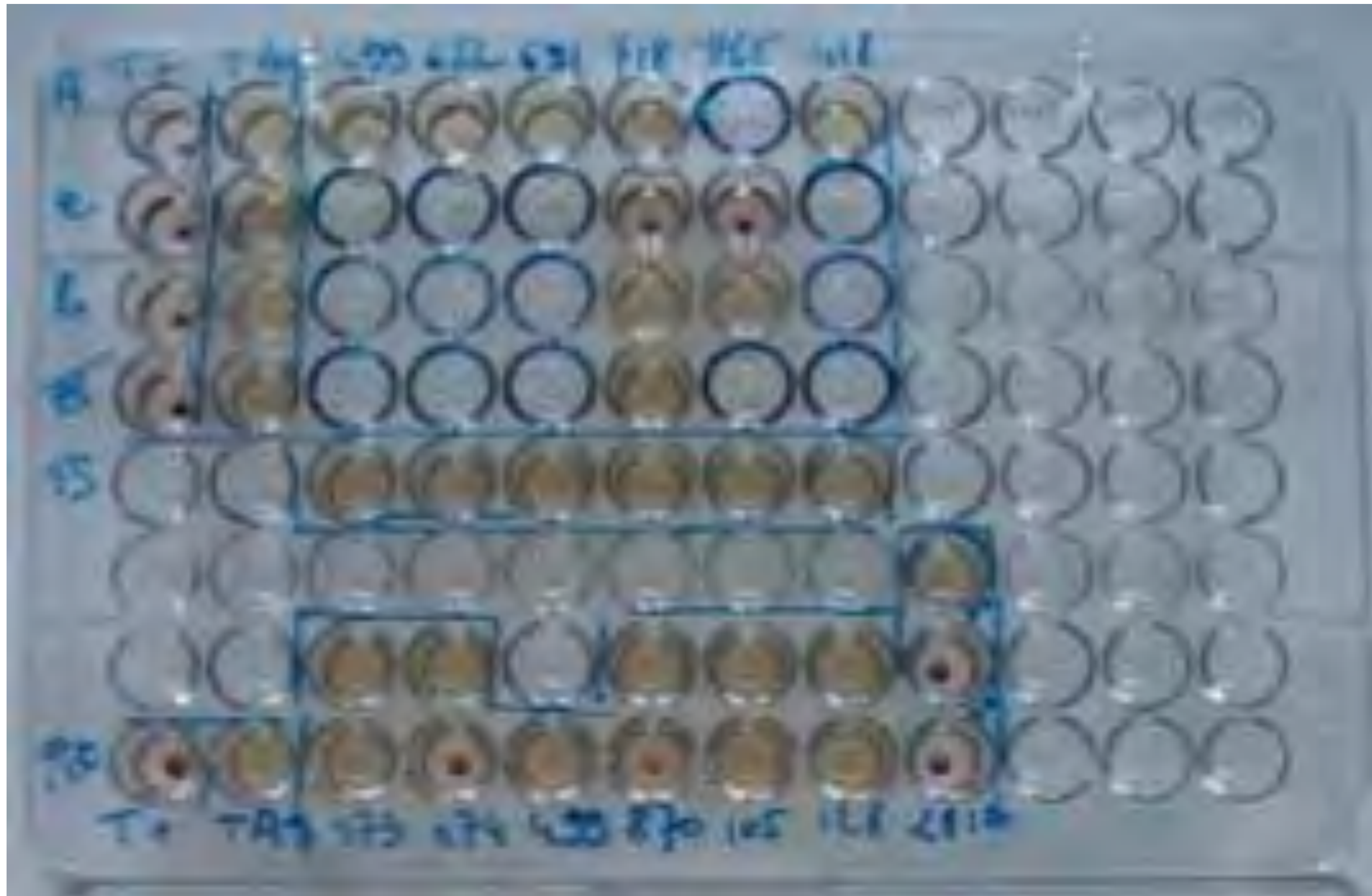
Principe: inhiber une fonction propre du virus (hémagglutination)

Ag (utilisé) + sérum du patient + GR:

Réaction - : Ag-GR: hémagglutination

Réaction +: Ag-Ac-GR: sédimentation


Inhibition de l'hémagglutination (IHA)
Hématies
+
Virus hémagglutinant
Hémagglutination
Hématies
+
Virus hémagglutinant
+
Anticorps anti-virus hémagglutinant
Neutralisation des virus : inhibition de l'hémagglutination



- **Neutralisation de l'ECP pour les virus lytiques exp poliovirus**

Principe:

- ✓ **Culture en cellules in vitro + sérum du patient**
- ✓ **ECP + → Rt - → absence d'Ac**
- ✓ **ECP- → Rt + → présence d'Ac**

- **Réaction de fixation du complément**
- **Technique radioimmunologique par procédé radioactif actif: délaissée**
- **Immunoblot: ELISA sur membrane**
- **Il existe des tests rapides**



Bandelettes de western blot en fin de réaction : une bande colorée apparait lorsque le sérum testé contient des anticorps reconnaissant l'antigène adsorbé à cet endroit-là sur la bandelette.



Test sérologique HIV-1 et –2 rapide

Comment choisir une technique sérologique?

- **Simple et reproductible**
- **Fiable**
- **cout↘**
- **Sensibilité↗ faux - ↘**
- **spécificité↗ faux +↘**

Comment interpréter une sérologie?

- **Délai d'apparition des anticorps (variable /virus)**
- **État immunitaire du sujet (immunodéprimé, nouveau-né)**
- **Interprétation:**

✓ **02 sérums: précoce (début des signes cliniques) et tardif (15 à 20j)**

✓ **Séroconversion ou ascension significative du taux d'Anticorps**

✓ **IgM +++ parfois indicateur de primoinfection**